



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

⑧7 EP 0 325 872 B1

⑩ DE 38 74 119 T 2

⑤1 Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 12 P 19/18**  
C 07 H 3/06  
C 08 B 37/02  
A 23 L 1/236

②1	Deutsches Aktenzeichen:	38 74 119.9
⑧6	Europäisches Aktenzeichen:	88 403 084.2
⑧6	Europäischer Anmeldetag:	6. 12. 88
⑧7	Erstveröffentlichung durch das EPA:	2. 8. 89
⑧7	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	26. 8. 92
④7	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	7. 1. 93

DE 38 74 119 T 2

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1  
29.01.88 FR 8801041

⑦3 Patentinhaber:  
Bioeurope, Toulouse, FR

⑦4 Vertreter:  
von Kreisler, A., Dipl.-Chem.; Selting, G., Dipl.-Ing.;  
Werner, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Fues, J.,  
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Böckmann gen. Dallmeyer,  
G., Dipl.-Ing.; Hilleringmann, J., Dipl.-Ing.; Jönsson,  
H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Meyers, H., Dipl.-Chem.  
Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 5000 Köln

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:  
AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

⑦2 Erfinder:  
Paul, Francois Bernard, F-31650 Saint-Orens, FR;  
Lopez Munguia Canales, Agustin, Coyoacan Mexico  
04100 D.F., MX; Remaud, Magali, F-31520 Romonvill  
Saint Agne, FR; Pelenc, Vincent Pascal, F-31400  
Toulouse, FR; Monsan, Pierre Frederic, F-31700  
Blagnac, FR

⑤4 Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Oligodextranen, verwendbar bei der Produktion von  
Ersatzmitteln für Zucker, und diese Oligodextrane.

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel III 5 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 38 74 119 T 2

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Oligodextranen, die bei der Produktion von Zuckerersatzstoffen brauchbar sind, sowie neue Oligodextrane.

Aus GB-A-749 515 ist bekannt, Dextrane mit hohem Molekulargewicht, höher als eine Million herzustellen (Polymerisationsgrad höher als 6000 Glucose-Einheiten) durch Einwirkung des Lactobakteriums *Leuconostoc mesenteroides* auf Saccharose. Nach Y. Mitsuishi et al., Carbohydrate Research 127 (1984), S. 331-337, ist ferner bekannt, daß der Stamm NRRL B-1299 dieses Bakteriums durch Fermentation Dextrane erzeugt, die  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindungen enthalten, welche die Verzweigungsstellen dieser Dextrane bilden, und daß sich diese Dextrane enzymatisch hydrolysieren lassen, um Oligosaccharide mit  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindungen zu ergeben.

Paul et al. beschreiben ihrerseits in Carbohydrate Research 149 (1986), S. 433-441, die Herstellung von Oligosacchariden durch Zusammenbringen von Saccharose mit Maltose in Gegenwart von Dextransucrase, bei der es sich um eine Glucosyltransferase handelt, die von Kulturen des Stammes NRRL B-512F von *Leuconostoc mesenteroides* gebildet wird. Die erzeugten Oligosaccharide enthalten jedoch keine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindungen.

Vor der vorliegenden Erfindung war es jedoch nicht bekannt, die direkte enzymatische Synthese von Oligodextranen (Dextrane mit einem niederen Polymerisationsgrad), die wenigstens eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung enthalten, ausgehend von Saccharose und einem Zucker durchzuführen, der die aus Saccharose stammenden Glucose-Reste bindet.

Es ist gerade das Ziel der vorliegenden Erfindung, ein solches Verfahren bereitzustellen.

Speziell betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Oligodextranen, die eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung enthalten, entsprechend der allgemeinen Formel  $[O-\alpha-D\text{-Glucopyranosyl-(1} \rightarrow 2)][O-\alpha-D\text{-glucopyranosyl-(1} \rightarrow 6)]_n A$ , worin A der Rest eines Glucose-bindenden Zuckers ist, ausgewählt aus Maltose, Isomaltose, Isomaltotriose,  $\alpha$ -Methylglucosid und Glucose, n den Wert 1, 2 oder 3 hat, die  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung sich am nichtreduzierenden Ende befindet oder einen Verzweigungspunkt eines jeden Oligodextrans bildet, dadurch gekennzeichnet, daß Saccharose und ein Glucose-bindender Zucker, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Maltose, Isomaltose, Isomaltotriose,  $\alpha$ -Methylglucosid und Glucose, in Gegenwart des Enzyms Glucosyltransferase, gewonnen aus dem Stamm NRRL B-1299 des Lactobakteriums *Leuconostoc mesenteroides* etwa 2 bis 48 h lang in wäßrigem Milieu zusammengebracht werden.

Bezüglich neuer Produkte betrifft die Erfindung auch Oligodextrane entsprechend der allgemeinen Formel  $[O-\alpha-D\text{-Glucopyranosyl-(1} \rightarrow 2)][O-\alpha-D\text{-glucopyranosyl-(1} \rightarrow 6)]_n A$ , worin A ein Maltose-Rest ist, n den Wert 1, 2 oder 3 hat, die  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung sich am nichtreduzierenden Ende befindet oder einen Verzweigungspunkt eines jeden Oligodextrans bildet.

Die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellten Oligodextrane, welche eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung enthalten, die sich an deren nicht-reduzierendem Ende befindet oder die einen Verzweigungspunkt des Oligodextrans bildet, ob sie nun an sich neu sind oder nicht, sind besonderes beständig gegenüber Hydrolyse durch Glucohydrolase-Enzyme wie etwa Endodextranase und Glucoamylase, was auf die Anwesenheit der seltenen  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidischen Bindung zurückgeht, die sich an deren nicht-reduzierendem Ende befindet oder die einen Verzweigungspunkt des Oligodextrans bildet.

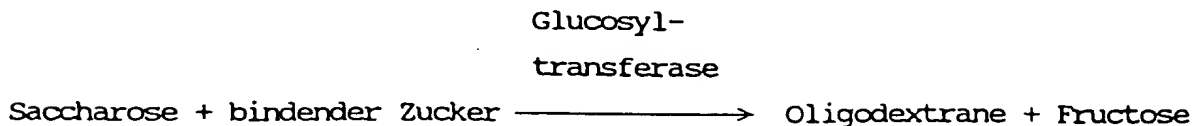
Diese Eigenschaft macht sie brauchbar als Ballast- oder Füllstoffe in Zuckerersatzstoffen, die im Menschen nur wenig oder

gar nicht metabolisiert werden. Sie können daher in kalorienarmen Nahrungsmittelzubereitungen verwendet werden, gemischt mit einem intensiven Süßstoff wie etwa Aspartam oder dergleichen.

Die erfindungsgemäßen Oligosaccharide können auch Wachstum und Entwicklung gewisser Mikroorganismen fördern, die für die Darmflora günstig sind. Diese Eigenschaft macht sie gleichermaßen brauchbar als Zusätze bei der Tierernährung (Zusätze bei der Tierzucht) wie auch bei der menschlichen Ernährung (dietisch oder nährend).

Die Erfindung betrifft also außerdem die Verwendung von Oligodextranen, die eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung enthalten und der allgemeinen Formel  $[O-\alpha-D\text{-Glucopyranosyl-(1} \rightarrow 2)]_n [O-\alpha-D\text{-glucopyranosyl-(1} \rightarrow 6)]_m A$  entsprechen, worin A der Rest eines Glucose-bindenden Zuckers ist, ausgewählt aus Maltose, Isomaltose, Isomaltotriose,  $\alpha$ -Methylglucosid und Glucose, n den Wert 1, 2 oder 3 hat, die  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung sich am nichtreduzierenden Ende befindet oder einen Verzweigungspunkt eines jeden Oligodextrans bildet, als Füllstoff in Zuckerersatzstoffen oder als Nahrungszusätze, die eine günstige Wirkung auf die Darmflora in Mensch und Tier ausüben.

Wie vorstehend erwähnt, wird die enzymatische Synthesereaktion durchgeführt in Gegenwart des Enzyms Glucosyltransferase (E.C:2.4.1.5), das aus dem Stamm NRRL B-1299 des Bakteriums *Leuconostoc mesenteroides* gewonnen wird. Diese Reaktion läßt sich darstellen anhand der allgemeinen Gleichung:



Der Stamm NRRL B-1299 ist zu beziehen durch N.R.R.C (Northern Regional Research Center), dessen Adresse wie folgt lautet:

Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, 1815 North University Street, Peoria. Illinois 61604, USA. Er wurde Anfang der fünfziger Jahre charakterisiert, ausgehend von einer Auswahl von Mikroorganismen, die aus dem Boden isoliert worden waren. Er wird unter anderem in folgender Veröffentlichung verzeichnet: "Characterization and Classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria", A. Jeanes et al., (1954) J.Amer.Chem.Soc. 76, 5041-5052.

Selbstverständlich können anstelle des vorerwähnten Stammes auch andere Stämme verwendet werden, die aus diesem abgeleitet sind und erhalten werden durch klassische Mutagenese, d.h., durch Bestrahlung von Stämmen oder Einwirkung von Chemikalien auf diese Stämme und anschließendes Kultivieren überlebender Individuen, oder erhalten werden durch Selektion natürlicher Mutanten. Für die Zwecke dieser Erfindung werden diese mutierten Stämme als gleichwertig bezüglich der vorerwähnten Stämme erachtet.

Die Glucosyltransferase kann dadurch erhalten werden, daß der Stamm NRRL B-1299 des Lactobakteriums *Leuconostoc mesenteroides* in einem geeigneten Nährmedium kultiviert wird, das insbesondere Saccharose enthält, so daß die Produktion von Glucosyltransferase erfolgt. Nach Wachstum der Bakterien wird die enzymatische Wirkung durch Zugabe von Polyethylenglycol derart extrahiert, daß die verschiedenen Formen der Glucosyltransferase gefällt und angereichert werden: Extrazellulär, gebunden an Zellen und unlösliche Polysaccharide, und intrazellulär. Dieses Enzympräparat enthält also vollständige Zellen von *L. mesenteroides* B-1299. Es lassen sich bekannte Methoden zum Aufschließen der Zellen am Ende der Kultivierung anwenden, um einerseits die enzymatische Aktivität zu erhöhen, und andererseits die Zellen zu zerstören [mechanisches Zerkleinern, Anwendung chemischer oder enzymatischer Agenzien (Lysozym,...)]. Diese Operation ist jedoch nicht unbedingt notwendig. Die Entziehung der Enzymaktivität mit Polyethylenglycol wird ein zweites Mal durchgeführt, nachdem der erste Niederschlag

(erhalten nach der ersten Extraktion) wiederaufgelöst worden ist, zum Beispiel mit Hilfe eines 20 mM Natriumacetat-Puffers, pH 5,4, der 0,02 g/l Calciumchlorid enthält. Die zweite Fällung enthält die gesamte Enzymaktivität. Sie läßt sich in konzentrierter Form ohne Aktivitätsverlust lyophilisieren oder gefrieren. Auch andere Reinigungsmethoden wie Zentrifugation, Ultrafiltration oder chromatographische Verfahren lassen sich anwenden.

Die enzymatische Synthese der Oligodextrane wird durchgeführt mit Hilfe dieses Enzympräparats oder einer Fraktion dieses Präparats, die einer bestimmten Enzymform entspricht (intrazelluläres Enzym, nach Aufschluß der Zellen extrazelluläres Enzym, gebunden an unlösliche Polymere, lösliches extrazelluläres Enzym) in Gegenwart von Saccharose, die das Substrat der Reaktion darstellt, und einem Zucker, von dem man weiß, daß er als Bindungspartner für Glucose fungieren kann, wie z.B. Maltose (oder ein Maltose-reiches Material wie etwa Stärkehydrolysat), Isomaltose,  $\alpha$ -Methylglucosid, Isomaltotriose und Glucose (oder ein Glucose-reiches Material wie etwa Stärkehydrolysat).

Als Hinweis möge dienen, daß die Reaktion durchgeführt werden kann zwischen 5 und 45°C, vorzugsweise zwischen etwa 20 und 30°C. Der pH der Reaktion liegt zwischen 4,5 und 7, vorzugsweise zwischen 5 und 6. Die Reaktionsdauer liegt gewöhnlich zwischen etwa 2 und 48 h; sie hängt ab von der Konzentration des Enzyms im Synthesemedium. Vorzugsweise beträgt die Enzymkonzentration 0,20 bis 1 E/ml, kann aber höher sein, falls gewünscht. 1 Enzymeinheit (E) ist definiert als diejenige Enzymmenge, die notwendig ist, um 1  $\mu$ mol Fructose pro Minute unter folgenden Standardbedingungen zur Messung der Aktivität zu bilden:

- Saccharose 100 g/l
- 20 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,2
- 30°C.

Die Anteile an Saccharose und Glucose-bindendem Zucker sind nicht sonderlich kritisch. Als Hinweis möge dienen, daß eine Saccharose-Konzentration von 20 bis 600 g/l und eine Konzentration an Glucose-bindendem Zucker von 10 bis 300 g/l eingesetzt werden kann. Die höchsten Ausbeuten bei der Synthese von Oligodextranen werden erhalten, wenn das Verhältnis von Saccharose-Konzentration, ausgedrückt in g/l, zur Konzentration des Bindungspartners, ausgedrückt in g/l, zwischen 0,5 und 10, vorzugsweise zwischen 2 und 4 liegt.

Das Enzym kann entweder in freier Form eingesetzt werden (absatzweises Verfahren), oder eingeschlossen im Innern eines vernetzten Gels (zum Beispiel Calciumalginat-Gel), oder covalent gebunden auf einem unlöslichen Träger. Liegt das Enzym fixiert vor, so kann es in einem geeigneten Reaktor (Festbettreaktor, Fließbettreaktor etc.) zur kontinuierlichen Produktion von Oligodextranen eingesetzt werden.

Nach Einwirkung des Enzyms kann das Reaktionsmedium mit Hilfe einer Methode der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) im Umkehrphase zur Trennung der Oligodextrane analysiert werden (zum Beispiel mit einer Mikro-Bondapack C18-Säule von Millipore-Waters), wobei die Elution mit ultrareinem Wasser oder einer Mischung Wasser/Methanol [% Methanol zwischen 0 und 6% (Vol./Vol.)] durchgeführt wird. Diese quantitative Methode gestattet die Trennung aller Oligodextrane mit einem Polymerisationsgrad zwischen etwa 2 und 20.

Die Bestimmung bei der Reaktion gebildeter reduzierender Zucker läßt sich mit dem Reagens DNS (Natriumdinitrosalicylat in alkalischem Medium) vornehmen.

Die erhaltene Reaktionsmischung umfaßt Oligodextrane, die wenigstens eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung enthalten, Oligodextrane, die keine derartige Bindung enthalten, Fructose sowie Zucker, der unveränderte Glucose bindet.

Die Oligodextrane mit  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidischer Bindung können etwa 30 bis 55% der gesamten Oligodextrane ausmachen.

Je nach Molmasse der gewünschten Oligodextrane kann das Verfahren von Synthese und Reinigung angepaßt werden. Insbesondere ist die mittlere Molmasse der Oligodextrane abhängig vom Verhältnis Saccharose/Bindungspartner im Synthesemedium, und zwar ist sie umso höher je größer dieses Verhältnis ist. Nach der Synthese kann die Fructose im Reaktionsmedium belassen oder mit Hilfe einer Ionenaustauschchromatographie-Technik abgetrennt werden.

Auch ist darauf zu verweisen, daß zum Zweck der Erhöhung des Anteils an Oligodextranen, die eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung enthalten, dem Synthesemedium bestimmte Zusätze beigegeben werden können wie bestimmte mit Wasser mischbare Lösungsmittel wie etwa Polyether, z.B. Monoglyme, Diglyme etc., sowie bestimmte Salze wie etwa Magnesiumchlorid, Calciumchlorid etc..

Vorteilhaft ist es, wenn man die Oligodextrane, die keine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung enthalten, aus dem Reaktionsmedium zu beseitigen wünscht, letztere der Einwirkung von Hydrolasen zu unterwerfen wie etwa Glucoamylase von *Aspergillus niger* und/oder Endodextranase von *Penicillium* sp., um die Totalhydrolyse der Oligodextrane, die keine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung enthalten, durchzuführen. Dagegen widerstehen die Oligodextrane, die eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung enthalten, der Hydrolyse, besonders diejenigen mit einem Polymerisationsgrad von 4, 5, 6 und 7 (abgekürzt D.P. 4, D.P. 5, D.P. 6 und D.P. 7). Nach Einwirkung der Hydrolasen enthält das Reaktionsmedium Glucose, Fructose und die Oligodextrane, die eine oder mehrere  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindungen enthalten. Glucose und Fructose können, falls gewünscht, von den Oligodextranen durch Chromatographie abgetrennt werden, zum Beispiel mit Hilfe eines Kationenaustauscherharzes in der Calcium-Form. Die die Oligodextrane enthaltenden Fraktionen werden unter vermindertem Druck eingeengt, demineralisiert, über Aktivkohle filtriert und dann durch Lyophilisieren oder Zerstäuben getrocknet. Das Endprodukt be-



sitzt das Aussehen eines weißen Pulvers, ist leicht löslich in nichtgezuckertem Wasser (Löslichkeit 70% Gew./Gew.), zeigt neutralen pH und enthält 95 Gew.-% oder mehr an Oligodextranen, die eine oder mehrere  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindungen enthalten.

Die folgenden, nicht einschränkenden Beispiele werden gegeben, um die vorliegende Erfindung weiter zu veranschaulichen.

#### BEISPIEL 1

##### (a) Herstellung und Reinigung von Glucosyltransferase von L. mesenteroides B-1299

Der Stamm L. mesenteroides B-1299 wird in lyophilisierter oder in Gegenwart von 10% (Vol./Vol.) Glycerin gefrorener Form aufbewahrt.

Er wird in folgendem Kulturmedium kultiviert (Standardmedium):

- Saccharose: 40 g/l
- Hefeextrakt: 20 g/l
- Dikaliumphosphat: 20 g/l (zugesetzt in Form einer Lösung, deren pH mittels reiner Orthophosphorsäure auf 6,9 eingestellt worden ist)
- Magnesiumsulfat  $\cdot 7H_2O$ : 0,2 g/l
- Mangansulfat  $\cdot H_2O$ : 0,01 g/l
- Calciumchlorid  $\cdot 2H_2O$ : 0,02 g/l
- Natriumchlorid: 0,01 g/l
- Eisensulfat  $\cdot 7H_2O$ : 0,01 g/l.

Der pH des Kulturmediums beträgt 6,9. Das Kulturmedium und die Monokaliumphosphat-Lösung sind vorher durch Hitze sterilisiert worden (121°C, 20 min). Wird der pH während des Kultivierens nicht reguliert, so wird das Medium je nach Wachstum der Bakterien saurer. Am Ende des Kultivierens kann der pH 4,5 erreichen. Vorzugsweise wird der pH auf einen höheren Wert zwischen 5 und 6,5 eingestellt. Die Einstellung des pH wird mit Hilfe von 2N Soda oder einer alkalischen Saccharose-Lösung

vorgenommen (Saccharose 400 g/l; Soda 2N). Die letztere Lösung ist vorteilhaft, denn sie gestattet eine leichte Erhöhung der Zellendichte der Kultur und der Produktion des Enzyms.

Zusätze wie etwa Maltose (20 g/l) und das Tensid Tween (1%) begünstigen die Ausscheidung des Enzyms in das extrazelluläre Medium in löslicher Form.

Die nachstehende Tabelle 1 gibt die Ergebnisse von drei Kultivierungsversuchen wieder, die unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt worden sind.

TABELLE 1

Bedingungen der Kultivierung	Gesamte enzyma- tische Aktivität E/ml	Extrazel- luläre lösliche Aktivität E/ml	Konzentration an Unlöslichem (Zellen + Poly- saccharide) mg/ml	Unlösliche Aktivität E/ml
<u>Versuch 1: Erlenmeyer</u> ohne pH-Regulierung Standardmedium	3,5	0,35	7,9	0,4
<u>Versuch 2: 2 l-Fermenter</u> Standardmedium + Malto- se (20 g/l) + Tween® (1%), ohne pH-Regulie- rung	2,75	0,6	4,3	0,5
<u>Versuch 3: 2 l-Fermenter</u> Standardmedium + Malto- se (20 g/l) + Tween® (1%) + pH-Regulierung auf pH 5,6 durch Zu- gabe v. alkischer Sac- charose (Saccharose 400 g/l, 2N Soda)	4,0	0,6	8,4	0,4

Die Temperatur des Kulturmediums beträgt 27°C. Es wird mit 500 U/min gerührt und mit 1 vvm belüftet.

Nach 6 h 30 min langem Kultivieren beträgt die Enzymkonzentration im Kulturmedium 4 E/ml bei Versuch 3, davon 0,6 E/ml in löslicher extrazellulärer Enzymform. 85% der Glucosyltransferase sind an Zellen und/oder Polysaccharide in Form unlöslicher Aggregate gebunden.

Nach dem Wachstum werden die verschiedenen Formen des Enzyms aus dem Kulturmedium durch Fällung in Gegenwart von Polyethylenglycol geringer Molmasse (PEG 1500) extrahiert. Die gesamte Enzymaktivität fällt gleichzeitig mit dem durch die Bakterien erzeugten Polysaccharid und den Zellen aus, wenn die Konzentration an PEG 1500 20% (Gew./Vol.) erreicht.

Die gefällte Fraktion wird zentrifugiert (10 min, 10 000 g) oder nach dem Absetzen aufgearbeitet (12 h, 4°C, in Gegenwart eines Bakteriostatikums wie z.B. Natriumsulfit mit 1 g/l oder Natriumbenzoat mit 2 g/l). Nach zwei aufeinanderfolgenden Extraktionen mit Polyethylenglycol wird das Enzympräparat lyophilisiert. Die Ausbeute der Enzymextraktion liegt bei 100%.

(b) Enzymatische Synthese von Oligodextranen mit löslicher und unlöslicher Glucosyltransferase von L. mesenteroides B-1299

Die Synthese wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Saccharose: 100 g/l
- Maltose: 50 g/l
- Temperatur: 30°C
- 20 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,2
- Natriumazid: 0,5 %/o. (Bakterizid)
- Enzymkonzentration: 0,3 E/ml.

Nach 20stündiger Reaktion wird das Enzym durch Wärme inaktiviert (30 min, 80°C), dann werden die Oligodextrane mit Hilfe der vorstehend beschriebenen HPLC-Methode analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

TABELLE 2

Zusammensetzung des Reaktionsmediums nach Einwirkung löslicher und unlöslicher Glucosyltransferase von L. mesenteroides B-1299

Zucker	Konzentration, g/l
Fructose	52,0
Maltose	15,3
Panose (Trisaccharid)	16,6
Oligodextran mit D.P. 4	14,9
Oligodextran mit D.P. 4, enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	5,3
Oligodextran mit D.P. 5	7,0
Oligodextran mit D.P. 5, enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	18,0
Oligodextran mit D.P. >5, enthaltend wenigstens eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	5,9
Ausbeute an Oligodextranen, enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung *	30%
Ausbeute der Reaktion des Bindungspartners **	84%

Die Ausbeuten werden auf folgende Weise ausgedrückt:

$$(*) \quad \frac{[\text{Oligodextrane } \alpha(1 \rightarrow 2)], \text{ g/l}}{0,474 \cdot (\text{Saccharose}) + (\text{Maltose}), \text{ g/l}}$$

$$(**) \quad \frac{[\text{Oligodextrane, gesamt}], \text{ g/l}}{0,474 \cdot (\text{Saccharose}) + (\text{Bindungspartner Anfang} - \text{Bindungsp. Ende}), \text{ g/l}}$$

(c) Enzymatische Synthese von Oligodextranen mit löslicher und unlöslicher Glucosyltransferase von L. mesenteroides B-1299 in Gegenwart von Zusätzen

Drei Synthesen 1, 2 und 3 werden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Saccharose: 100 g/l
- Maltose: 33 g/l
- 20 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,2
- Natriumazid: 0,5 %/.
- Enzymkonzentration: 1 E/ml.
- Temperatur: 30°C,

allerdings mit folgenden Unterschieden:

- \* Synthese 1: Inkubationsdauer 6 h (ohne Zusatz),
- \* Synthese 2: Inkubationsdauer 23 h, in Gegenwart von 500 mM Magnesiumchlorid und 5 mM Calciumchlorid,
- \* Synthese 3: Inkubationsdauer 23 h, in Gegenwart von 300 mM Calciumchlorid.

Nach der angegebenen Inkubationszeit wird das Enzym durch Wärme inaktiviert (30 min, 80°C), dann werden die Oligodextrane mit Hilfe der vorstehend beschriebenen HPLC-Methode analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion verlangsamt sich stark in Gegenwart höherer Konzentrationen an Salzen (Calciumchlorid und Magnesiumchlorid). Jedoch läßt sich eine starke Zunahme an wenigstens eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung enthaltenen Oligodextranen gegenüber der Kontrollsynthese (durchgeführt ohne Zusatz) feststellen.

TABELLE 3

Zusammensetzung des Reaktionsmediums nach Einwirkung löslicher und unlöslicher Glucosyltransferase von L. mesenteroides B-1299 in Gegenwart von Zusätzen

Zucker	Synthese 1	Synthese 2	Synthese 3
Fructose	53,7	47,3	54,6
Maltose, Leucrose	7,9	11,0	8,9
Panose	6,6	9,7	6,0
Oligodextran mit D.P. 4	8,3	7,7	6,0
Oligodextran mit D.P. 4, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	1,9	5,9	3,7
Oligodextran mit D.P. 5	5,0	5,4	4,0
Oligodextran mit D.P. 5, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	12,2	22,8	17,9
Oligodextran mit D.P. >5, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	3,8	8,8	11,2
Ausbeute an Oligodextranen, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	22%	47%	41%
Ausbeute der Reaktion mit dem Bindungspartner	52%	75%	61%

BEISPIEL 2

Synthese von Oligodextranen mit löslicher Glucosyltransferase von L. mesenteroides B-1299

Nach Zentrifugieren des Kulturmediums zur Beseitigung der Zellen und der unlöslichen Polymere (10 000 g, 20 min) wird der Überstand einer Flüssig/flüssig-Extraktion mit Polyethylenglycol 1500 gemäß dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren unterworfen. Die Ausbeute der Glucosyltransferase-Extraktion

beträgt mehr als 85%. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Das Enzym wird dann in 20 mM Natriumacetat-Pufferlösung, pH 5,2, gefroren oder lyophilisiert.

Die Synthese wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Saccharose: 100 g/l
- Maltose: 50 g/l
- Temperatur: 30°C
- 20 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,2
- Enzymkonzentration: 0,5 E/ml.
- Reaktionsdauer: 4 h.

Nachdem die Saccharose vollständig durch die Glucosyltransferase verbraucht ist, wird das Enzym durch Wärme denaturiert (30 min, 80°C). Die Analyse der im Reaktionsmedium vorhandenen Oligodextrane wird mit Hilfe der vorstehend beschriebenen HPLC-Methode durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

TABELLE 4

Zusammensetzung des Reaktionsmediums nach Einwirkung löslicher Glucosyltransferase von L. mesenteroides B-1299

Zucker	Konzentration, g/l
Fructose	50,5
Maltose	11,6
Panose	17,4
Oligodextran mit D.P. 4	19,0
Oligodextran mit D.P. 4, enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	3,1
Oligodextran mit D.P. 5	9,9
Oligodextran mit D.P. 5, enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	18,2
Oligodextrane mit D.P. > 5, enthaltend wenigstens eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	13,6
Ausbeute an Oligodextranen, enthaltend wenigstens eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	36%
Ausbeute der Reaktion des Bindungspartners	95%



Bei den Ausbeuten sind die Oligodextrane mit D.P. größer oder gleich 7, die auf den mit Hilfe dieser Methode erhaltenen Chromatogrammen nicht in Erscheinung treten, nicht berücksichtigt.

### BEISPIEL 3

#### Synthese von Oligodextranen mit unlöslicher Glucosyltransferase von *L. mesenteroides* B-1299

Das Kulturmedium wird zentrifugiert (20 min, 10 000 g, 4°C), dann wird der Zentrifugationsrückstand mehrere Male mit 20 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,2, gewaschen. Dann wird die Lösung lyophilisiert, so daß jegliche bakterielle Vermehrung vermieden wird.

Die Synthese der Oligodextrane wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Saccharose: 100 g/l
- Maltose: 50 g/l
- Temperatur: 30°C
- 20 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,2
- Natriumazid: 0,5 ‰
- Enzymkonzentration: 0,9 E/ml.

Nach 8 h Inkubation ist die Saccharose vollständig aufgebraucht. Tabelle 5 gibt die Zusammensetzung der Oligodextrane im Synthesemedium wieder.

TABELLE 5

Zusammensetzung des Reaktionsmediums nach Einwirkung unlöslicher Glucosyltransferase (an Zellen gebunden) von L. mesenteroides B-1299

Zucker	Konzentration, g/l
Fructose	51,2
Maltose	22,0
Panose	12,8
Oligodextrane mit D.P. 4	9,6
Oligodextrane mit D.P. 4, enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	5,7
Oligodextrane mit D.P. 5	3,7
Oligodextrane mit D.P. 5, enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	13,9
Oligodextrane mit D.P. > 5, enthaltend wenigstens eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	3,7
Ausbeute an Oligodextranen, enthaltend wenigstens eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	24%
Ausbeute der Reaktion des Bindungspartners	65%

BEISPIEL 4

Einfluß der Konzentration der löslichen Glucosyltransferase von L. mesenteroides B-1299 auf die Synthese von Oligodextranen

Versuchsbedingungen:

- Saccharose: 100 g/l
- Maltose: 50 g/l
- 20 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,2
- Temperatur: 30°C

Es sind drei Enzymkonzentrationen angewandt worden: 0,17, 0,5 und 2 E/ml. Nach vollständigem Verbrauch der Saccharose werden die drei Reaktionsmedien analysiert. Die Ergebnisse der drei Synthesen sind identisch sowohl im Hinblick auf die Ausbeute der Reaktion des Bindungspartners als auch auf die Ausbeute an Oligodextranen, die wenigstens eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung enthalten.

#### BEISPIEL 5

##### Einfluß des pH auf die enzymatische Synthese von Oligodextranen

Versuchsbedingungen:

- Saccharose: 100 g/l
- Maltose: 50 g/l
- Temperatur: 30°C
- Enzymkonzentration: 1 E/ml
- 30 mM Natriumcitrat/phosphat-Puffer.

Es sind drei pHs geprüft worden: 5,2, 6,0 und 6,4. Die Aktivität des löslichen und unlöslichen Enzyms fällt leicht, wenn der pH über 6,0 liegt. Jedoch wird im Hinblick auf die Zusammensetzung der Oligodextrane im Reaktionsmedium kein signifikanter Unterschied aufgrund des pH-Werts beobachtet.

#### BEISPIEL 6

##### Synthese von Oligodextranen in Gegenwart einer Mischung von Isomaltose und Isomaltotriose als Bindungspartner mit unlöslicher Glucosyltransferase von *L. mesenteroides* B-1299

Versuchsbedingungen:

- Saccharose: 100 g/l
- Bindungspartner: 50 g/l

Zusammensetzung des Bindungspartners:

- Isomaltose: 59%
- Isomaltotriose: 36%
- Glucose: 5%
- Temperatur: 30°C
- Natriumazid: 0,5 %/.
- 20 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,2
- Enzymkonzentration: 1 E/ml.

Nach Verbrauch der Saccharose wird die Analyse des Reaktionsmediums mit Hilfe der vorstehend beschriebenen HPLC-Methode durchgeführt (Tabelle 6).

TABELLE 6

Zusammensetzung des Reaktionsmediums nach Einwirkung unlöslicher Glucosyltransferase von L. mesenteroides B-1299

Zucker	Konzentration, g/l
Fructose	53,0
Isomaltose	15,0
Isomaltotriose	6,1
Oligodextrane mit D.P. 4, enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	10,4
Isomaltotetrose	2,4
Oligodextrane mit D.P. 5, enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	9,4
Ausbeute an Oligodextranen, enthaltend wenigstens eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	20,5%
Ausbeute der Reaktion des Bindungspartners	29,0%

BEISPIEL 7

Synthese von Oligodextranen in Gegenwart von  $\alpha$ -Methylglucosid mit Glucosyltransferase von *L. mesenteroides* B-1299

Versuchsbedingungen:

- Saccharose: 100 g/l
- $\alpha$ -Methylglucosid: 50 g/l
- übrige Versuchsbedingungen siehe Beispiel 6.

Nach Verbrauch der Saccharose ergibt die HPLC-Analyse des Reaktionsmediums folgende Ergebnisse (Tabelle 7).

TABELLE 7

Zusammensetzung des Reaktionsmediums nach Einwirkung unlöslicher Glucosyltransferase von *L. mesenteroides* B-1299

Zucker	Konzentration, g/l
Fructose	53,0
$\alpha$ -Methylglucosid	34,0
Methylisomaltosid	4,8
Methylierte Oligodextrane, enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	9,3
Methylisomaltotriosid	1,4
Methylisomaltotetrosid	0,8
Ausbeute an Oligodextranen, enthaltend wenigstens eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	10%
Ausbeute der Reaktion des Bindungspartners	26%

BEISPIEL 6

Enzymatische Synthese von Oligodextranen in Gegenwart verschiedener Saccharose-Konzentrationen mit löslicher und unlöslicher Glucosyltransferase von L. mesenteroides B-1299

Versuchsbedingungen:

- Temperatur: 30°C
- 20 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5,2
- Natriumazid: 0,5 ‰
- Verhältnis Saccharose/Maltose: 3

Synthese 1:

- Trockenmaterial: 20% (Gew./Gew.)
- Saccharose: 15% (Gew./Gew.)
- Maltose: 5% (Gew./Gew.)
- Enzymkonzentration: 0,6 E/ml

Synthese 2:

- Trockenmaterial: 35% (Gew./Gew.)
- Saccharose: 26% (Gew./Gew.)
- Maltose: 9% (Gew./Gew.)
- Enzymkonzentration: 1,2 E/ml

Synthese 3:

- Trockenmaterial: 40% (Gew./Gew.)
- Saccharose: 30% (Gew./Gew.)
- Maltose: 10% (Gew./Gew.)
- Enzymkonzentration: 1,8 E/ml

Nach 21stündiger Reaktion wird das Enzym durch Wärme inaktiviert (30 min, 80°C). Die HPLC-Analysen der Reaktionsmedien sind in Tabelle 8 wiedergegeben.

TABELLE 8

Zusammensetzung der 3 Synthesemedien nach Einwirkung löslicher und unlöslicher Glucosyltransferase (an Zellen gebunden) von *L. mesenteroides* B-1299

Zucker	Konzentration, g/l		
	Synthese 1	Synthese 2	Synthese 3
Fructose	90,0	150,0	180,0
Maltose	8,7	9,7	11,9
Leucrose	6,3	13,9	20,4
Panose	11,7	17,5	22,9
Oligodextran mit D.P. 4	14,8	25,5	35,2
Oligodextran mit D.P. 4, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	5,7	10,1	13,5
Oligodextran mit D.P. 5	10,6	17,9	20,1
Oligodextran mit D.P. 5, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	28,9	44,1	53,4
Oligodextrane, mit D.P. $\geq 5$ , enth. wenigstens eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bind.	15,1	36,6	46,2
Ausbeute an Oligodextranen, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	39%	40,5%	38%
Ausbeute der Reaktion des Bindungspartners	76%	75%	70%

Das Synthesemedium wird anschließend der Einwirkung einer Mischung aus Glucoamylase von *A. niger* (2 E/ml) und Endodextranase von *Penicillium* sp. (17 E/ml) für 6 h bei 40°C unterworfen. Die enzymatische Reaktion wird durch 30minütiges Erhitzen auf 90°C gestoppt. Glucose und Fructose werden durch Chromatographie an einem Austauschharz in der Calcium-Form abgetrennt.

Die Konzentration an Oligodextranen im Reaktionsmedium, die eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung enthalten, beträgt 57 g/l für Synthese 1, 107 g/l für Synthese 2, und 122 g/l für Synthese 3.

Die Verteilung der Oligodextrane ist wie folgt:

	Synthese 1 %	Synthese 2 %	Synthese 3 %
Oligodextrane mit D.P. 4, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	24	26	30
Oligodextrane mit D.P. 5, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	69	65	57
Oligodextrane mit D.P. 6, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	4	5	7
Oligodextrane mit D.P. 7, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	3	4	6

#### BEISPIEL 9

Synthese von Oligodextranen in Gegenwart eines Maltose-reichen Glucose-Sirups (Nutriose R 725) mit löslicher und unlöslicher Glucosyltransferase von L. mesenteroides B-1299

Nutriose R 725 ist ein Produkt der Société Roquette Frères (Lestrem, Frankreich), das einen erhöhten Gehalt an Maltose und Maltotriose enthält.

Mittlere Zusammensetzung des Glucose-Sirups Nutriose R 725:

- Trockenmaterial: 68% (Gew./Gew.)
- Glucose: 1,5%
- Maltose: 77%
- Maltotriose: 20%
- Produkte mit D.P.  $\geq 4$ : 1,5%



Dieser Glucose-Sirup wird als Bindungspartner unter folgenden Bedingungen verwendet:

Synthese 1:

- Saccharose-Konzentration: 100 g/l
- Nutriose R 725: 68 g/l
- Verhältnis Saccharose/Maltose: 2
- Enzymkonzentration: 0,3 E/ml
- übrige Bedingungen: siehe Beispiel 8

Synthese 2:

- Saccharose-Konzentration: 100 g/l
- Nutriose R 725: 42 g/l
- Verhältnis Saccharose/Maltose: 3
- Enzymkonzentration: 0,3 E/ml
- übrige Bedingungen: siehe Beispiel 8

Nach 21stündiger Inkubation wird das Reaktionsmedium mittels HPLC analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

TABELLE 9

Zusammensetzung des Reaktionsmediums nach Einwirkung löslicher und unlöslicher Glucosyltransferase von *L. mesenteroides* B-1299

Zucker	Konzentration, g/l	
	Synthese 1	Synthese 2
Fructose	53,0	52,0
Maltose	18,2	9,7
Maltotriose	7,4	4,8
Panose	21,7	8,7
Oligodextran mit D.P. 4	14,3	8,2
Oligodextran mit D.P. 4, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	4,3	2,0
Oligodextran mit D.P. 5	4,9	4,6
Oligodextran mit D.P. 5, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	15,0	12,9
Oligodextrane mit D.P. > 5, enth. wenigstens eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bind.	3,8	8,5
Ausbeute an Oligodextranen, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	21%	26%
Ausbeute der Reaktion des Bindungspartners	74%	60%

Das Synthesemedium wird anschließend der Einwirkung einer Mischung aus Glucoamylase von *A. niger* (2 E/ml) und Endodextranase von *Penicillium* sp. (17 E/ml) für 6 h bei 40°C unterworfen. Die enzymatische Reaktion wird durch 30minütiges Erhitzen auf 90°C gestoppt. Glucose und Fructose werden durch Chromatographie an einem Austauschharz in der Calcium-Form abgetrennt.

Die Konzentration an Oligodextranen im Reaktionsmedium, die eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung enthalten, beträgt 30 g/l für Synthese 1 und 35 g/l für Synthese 2.

Die Verteilung der Oligodextrane ist wie folgt:

	Synthese 1 %	Synthese 2 %
Oligodextrane mit D.P. 4, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	23	23
Oligodextrane mit D.P. 5, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	72	70
Oligodextrane mit D.P. 6, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	3	4
Oligodextrane mit D.P. 7, enth. eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	2	3

#### BEISPIEL 10

Hydrolyse von Oligodextranen durch Glucoamylase von *A. niger* oder eine Mischung aus Glucoamylase von *A. niger* und Endodextranase von *Penicillium* sp.

Die verschiedenen Reaktionsmedien der Beispiele 1 bis 9 enthalten Oligodextrane, deren Polymerisationsgrad sich mit den Reaktionsbedingungen ändert. Es ist möglich, ein Produkt von Oligodextranen mit D.P. 4 und 5, enthaltend eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung, anzureichern durch Einwirkung von Hydrolasen, die ausschließlich die Bindungen  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  und  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  angreifen.

Ausgehend vom nichtreduzierenden Ende hydrolysiert die Glucoamylase von *A. niger* die Bindungen  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  und  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  der Oligodextrane. Ihre Wirkung wird durch das Vorhandensein einer  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidischen Bindung blockiert, ganz gleich wo

deren Position im Oligodextran ist. Die Endodextranase hydrolysiert endolytisch ausschließlich  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -glucosidische Bindungen in Substraten mit einem Polymerisationsgrad von 3 oder darüber. Jedoch hydrolysiert die Endodextranase keine Oligodextrane mit D.P. 4 und D.P. 5, die eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung am nichtreduzierenden Ende enthalten. Die kombinierte Wirkung dieser beiden Enzyme erlaubt die Gewinnung eines Produkts, das hauptsächlich aus Oligodextran mit D.P. 4 und Oligodextran mit D.P. 5 besteht.

Die im Medium durch die Wirkung von Glucosyltransferase von *L. mesenteroides* B-1299 auf Saccharose freigesetzte Fructose sowie die durch die Hydrolasen gebildete Glucose lassen sich gleichzeitig abtrennen mittels Chromatographie an Austauschharzen in der Calcium-Form, eine bekannte Technik, weitgehend industriell entwickelt für die Herstellung von Sirups mit hohen Fructose-Gehalten.

Läßt man die Glucoamylase von *A. niger* alleine einwirken, so zeigen die erhaltenen Oligodextrane einen höheren mittleren Polymerisationsgrad als im vorhergehenden Fall; tatsächlich wird die Wirkung der Glucoamylase am nichtreduzierenden Ende des Oligodextrans in Gegenwart einer  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidischen Bindung gestoppt.

#### Hydrolysebedingungen:

- Verdünnung des Reaktionsmediums auf 1/10
- Zugabe der Amyloglucosidase NOVO (300 AGE/ml): 3 AGE/ml
- Zugabe der Dextranase L AMANO (5000 E/ml): 17 E/ml
- Temperatur: 40°C
- Hydrolysedauer: 6 h

Nach 6stündiger Inkubation werden die beiden Enzyme durch Hitze inaktiviert (30 min, 100°C). Die HPLC-Analysen der beiden Reaktionsmedien nach Behandlung mit den beiden Hydrolasen sind in Tabelle 10 wiedergegeben.

TABELLE 10

	Oligodextrane enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ - Bindung, D.P. 4	Oligodextrane enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ - Bindung D.P. 5	Oligodextrane enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ - Bindung D.P. >5
Bindungspartner: Maltose; Synthesebedingungen: siehe Beispiel 3	8 g/l	17 g/l	2 g/l
Bindungspartner: Isomaltose, Iso- maltotriose; Synthesebedingungen: siehe Beispiel 6	22 g/l	5 g/l	1 g/l

BEISPIEL 11

Synthese und Reinigung von Oligodextranen, die eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung enthalten, mit löslicher und unlöslicher Glucosyltransferase von *Leuconostoc mesenteroides* B-1299

Nachdem die Glucosyltransferase wie in Beispiel 1(a) hergestellt und gereinigt worden ist, wird die Synthese der Oligodextrane unter den folgenden Bedingungen vorgenommen:

- Saccharose: 100 g/l
- Bindungspartner: Nutriose R 725: 44 g/l  
(Maltose 33 g/l)
- Verhältnis Saccharose/Maltose: 3
- Enzymkonzentration: 0,3 E/ml
- Natriumazid: 0,5 ‰
- pH 5,6 (eingestellt mit 1N Salzsäure)
- Temperatur: 30°C
- Inkubationsdauer: 40 h
- Reaktionsvolumen 2,5 l

Die enzymatische Reaktion wird gestoppt durch 15minütiges Erhitzen auf 90°C.

Nach der Synthese ist die Zusammensetzung des Reaktionsmediums wie folgt:

- Fructose: 49 g/l
- Leucrose: 6 g/l
- Maltose: 3 g/l
- Maltotriose: 7,5 g/l
- Panose: 12 g/l
- Oligodextran mit D.P. 4, enthaltend eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung: 3 g/l
- Oligodextran mit D.P. 4: 13 g/l
- Oligodextran mit D.P. 5, enthaltend eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung: 15 g/l
- Oligodextran mit D.P. > 5, enthaltend eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung: 10 g/l

Das Medium enthält auch Oligodextrane mit höherem D.P., die nicht in der chromatographischen Analyse des Synthesemediums erscheinen.

Das Synthesemedium wird anschließend der Einwirkung einer Mischung aus Glucoamylase von *A. niger* (3 E/ml) und Endodextranase von *Penicillium* sp. (17 E/ml) für 6 h bei 40°C unterworfen. Die enzymatische Reaktion wird durch 30minütiges Erhitzen auf 90°C gestoppt. Glucose und Fructose werden durch Chromatographie an einem Austauschharz in der Calcium-Form abgetrennt.

Man erhält so 40 g Oligodextrane, die eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung enthalten, mit einer Reinheit von 94%. Die Verteilung der Oligodextrane ist wie folgt:

	%
- Glucose, Leucrose	6
- Oligodextrane mit D.P. 4, enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	24
- Oligodextrane mit D.P. 5, enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	56
- Oligodextrane mit D.P. 6, enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	7
- Oligodextrane mit D.P. 7, enthaltend eine $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -Bindung	7

Das Präparat wird schließlich lyophilisiert. Nach der Lyophilisierung liegt das Produkt in Form eines weißen, nicht hygroskopischen Pulvers vor, ohne Zuckergeschmack und leicht löslich in Wasser. Seine Löslichkeit in Wasser bei 20°C beträgt 70% (Gew./Gew.).

### P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Herstellung von Oligodextranen, die eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung enthalten, entsprechend der allgemeinen Formel  $[O-\alpha-D\text{-Glucopyranosyl-(1} \rightarrow 2)]-[O-\alpha-D\text{-glucopyranosyl-(1} \rightarrow 6)]_nA$ , worin A der Rest eines Glucose-bindenden Zuckers ist, ausgewählt aus Maltose, Isomaltose, Isomaltotriose,  $\alpha$ -Methylglucosid und Glucose, n den Wert 1, 2 oder 3 hat, die  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung sich am nichtreduzierenden Ende befindet oder einen Verzweigungspunkt eines jeden Oligodextrans bildet, dadurch gekennzeichnet, daß Saccharose und ein Glucose-bindender Zucker, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Maltose, Isomaltose, Isomaltotriose,  $\alpha$ -Methylglucosid und Glucose, in Gegenwart des Enzyms Glucosyltransferase, gewonnen aus dem Stamm NRRL B-1299 des Lactobakteriums *Leuconostoc mesenteroides* etwa 2 bis 48 h lang in wäßrigem Milieu zusammengebracht werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der pH während der enzymatischen Reaktion zwischen 4,5 und 6 gehalten wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die enzymatische Reaktion bei einer Temperatur von etwa 5 bis 45°C durchgeführt wird.
4. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewichtsverhältnis von Saccharose/Glucose-bindender Zucker zwischen 0,5 und 10 liegt.



5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß dieses Verhältnis zwischen 2 und 4 liegt.
6. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzym-Konzentration zwischen 0,2 bis 1,0 Einheiten/ml Reaktionsmedium liegt.
7. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es in Gegenwart wenigstens eines Additivs, ausgewählt aus Monoglyme, Diglyme, Magnesiumchlorid und Calciumchlorid, durchgeführt wird.
8. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es einen zusätzlichen Schritt umfaßt, der darin besteht, auf das Reaktionsmedium nach Entfernung oder Inaktivierung des Glucosyltransferase-Enzyms wenigstens ein Hydrolase-Enzym einwirken zu lassen, um die im Reaktionsmedium vorhandenen Oligodextrane ohne  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung selektiv zu hydrolysieren.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydrolase eine Glucoamylase von *Aspergillus niger* und/oder eine Endodextranase von *Penicillium* sp. ist.
10. Oligodextrane, entsprechend der allgemeinen Formel  $[O-\alpha-D\text{-Glucopyranosyl}-(1 \rightarrow 2)]_n [O-\alpha-D\text{-glucopyranosyl}-(1 \rightarrow 6)]_m A$ , worin A der Maltose-Rest ist, n den Wert 1, 2 oder 3 hat, die  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung sich am nichtreduzierenden Ende befindet oder einen Verzweigungspunkt eines jeden Oligodextran bildet.
11. Verwendung von Oligodextranen, die eine  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung enthalten und der allgemeinen Formel  $[O-\alpha-D\text{-Glucopyranosyl}-(1 \rightarrow 2)]_n [O-\alpha-D\text{-glucopyranosyl}-(1 \rightarrow 6)]_m A$  entsprechen, worin A der Rest eines Glucosebindenden Zuckers ist, ausgewählt aus Maltose, Isomaltose, Isomaltotriose,  $\alpha$ -Methylglucosid und Glucose, n den Wert

1, 2 oder 3 hat, die  $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -glucosidische Bindung sich am nichtreduzierenden Ende befindet oder einen Verzweigungspunkt eines jeden Oligodextrans bildet, als Füllstoff in Zuckerersatzstoffen oder als Nahrungszusätze, die eine günstige Wirkung auf die Darmflora in Mensch und Tier ausüben.